

Определение икариина в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией

**О.А. Шевлякова^{1*}, К.Ю. Васильев¹, А.А. Ихалайнен¹, А.М. Антохин¹,
В.Ф. Таранченко¹, В.М. Гончаров¹, А.В. Аксенов¹, Д.А. Митрофанов¹,
И.А. Родин², О.А. Шпигун²**

¹Федеральное государственное унитарное предприятие «Научный центр «Сигнал»,
Российская Федерация, 107014, Москва, ул. Большая Оленья, д. 8

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Российская
Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3

*Адрес для переписки: Шевлякова Олеся Александровна, E-mail: olesya.shevlyakova@gmail.com

Поступила в редакцию 19 октября 2015 г., после исправления – 29 октября 2015 г.

С использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии разработан способ селективного определения икариина в пробах мочи. Для анализа биологических проб использовали обращенно-фазовый вариант высокоэффективной хроматографии на сорбентах с привитыми C18 группами. Определение осуществляли методом tandemной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации выбранных ионных переходов для положительных ионов (энергия соударений – 40 %, ионный переход – с $m/z = 677.2433 \rightarrow 313.0703$ (100 %), 369.1330 (35 %)).

Выбрана процедура пробоподготовки, включающая в себя твердофазную экстракцию на картриджах SUPELCO HLB, концентрирование органического экстракта в токе азота и перерастворение сухого остатка. Предел детектирования составил 1 нг-мл^{-1} . При валидации методики оценивали степень извлечения икариина из биологической жидкости (97 %), селективность и специфичность определения целевого соединения, а также влияние матрицы на ионизацию (4 %).

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, tandemная масс-спектрометрия, *Epimedium*, икариин, твердофазная экстракция, жидкость-жидкостная экстракция.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2015, vol. 19, no. 4, pp. 316-322
DOI: 10.15826/analitika.2015.19.4.006

Determination of icariin in urine by high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometric detection

**O.A. Shevlyakova^{1*}, K.J. Vasil'yev¹, A.A. Ihalaynen¹, A.M. Antokhin¹,
V.F. Taranchenko¹, V.M. Goncharov¹, A.V. Aksenov¹, D.A. Mitrofanov¹,
I.A. Rodin², O.A. Shpigun²**

¹Federal State Unitary Enterprise "Scientific Center "Signal", Bolshaya Olenya, 8, Moscow, 107014,
Russian Federation

²Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1-3, Moscow, 119991, Russian Federation

*Corresponding author: Olesya A. Shevlyakova, E-mail: olesya.shevlyakova@gmail.com

Submitted 19 October 2015, received in revised form 29 October 2015

Using the liquid chromatography tandem mass spectrometry, the approach for the selective detection of icariin in urine samples was developed. Biological samples analysis was performed by the reversed-phase chromatography using the C18 sorbent. The method of tandem mass spectrometry with the multiple reaction monitoring (MRM) mode using the electrospray ionization technique in positive ion mode was used (the collision energy - 40 %, $m/z = 677.2433 \rightarrow 313.0703$ (100 %), 369.1330 (35 %)). The sample preparation procedure comprising of the solid-phase extraction based on SUPELCO HLB cartridges, the evaporation of the organic extract in a stream of nitrogen and the reconstitution of residue was selected. The detection limit

was 1 ng ml⁻¹. During the method validation, the extraction of icariin from a biological fluid (97%), the selectivity and the specificity of the target compound as well as the matrix effects of ionization (4 %) were studied.

Key words: high performance liquid chromatography, tandem mass spectrometry, Epimedium, icariin, solid-phase extraction, liquid-liquid extraction.

ВВЕДЕНИЕ

Икариин (рис. 1) – один из основных действующих веществ горянки (*Epimedium*), используемой в фитомедицине во всём мире. Препараты на основе экстрактов данного растения улучшают функцию почек, нормализуют мочеиспускание, приводят в норму обмен жидкости в организме, устраняют головокружение, усталость, снимают стресс, омолаживают организм [1-4]. Современные фармакологические исследования показывают, что икариин обладает спектром биологических свойств и проявляет антиопухолевую, андрогенную и антидепрессантную активности [5-9]. В связи с этим существует необходимость исследования фармакокинетики икариина, метаболизма, биодоступности, а также расчета эффективной дозировки.

В настоящее время для определения икариина в биологических образцах применяют хроматографические методы со спектрофотометрическим детектированием в УФ-области [10] и капиллярный зонный электрофорез [11], которые требуют обязательного наличия стандартного образца (СО). При этом их чувствительность и достоверность идентификации достаточно низкая в сравнении с масс-спектральными методами анализа, а продолжительность анализа – высокая.

В последние годы для идентификации и определения икариина все чаще используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ/МС) в условиях ионизации электрораспылением (ИЭР) [12-14], где подготовка проб биологических образцов включает в себя осаждение белков органическим растворителем. Однако в биологических пробах, помимо белков, содержатся и другие эндогенные соединения: минеральные вещества (как естественные соли организма, так и соли, образующиеся в ходе нейтрализации минеральных кислот и оснований после гидролиза), большое количество сильнополярных азотсодержащих и кислородсодержащих соединений, таких как сахара и продукты их деградации, креатинин, мочевина, гиппуровая кислота, аминокислоты, а также в зна-

чительных количествах присутствуют экзогенные соединения (миорелаксанты, обезболивающие и противовоспалительные средства, изофлавоноиды и экдистероиды из пищевых добавок). Все эти компоненты, совместно именуемые матрицей, являются основным фактором, влияющим на чувствительность определения, в связи с тем, что обладают сходными экстракционными и аналитическими характеристиками [15]. За счёт компонентов матрицы происходит подавление ионизации и уменьшение сигнала целевого соединения. В итоге, при переходе от калибровочной смеси СО к реальным биопробам пределы обнаружения икариина увеличиваются на несколько порядков в зависимости от состава матрицы. В связи с вышеизложенным, необходимо выбирать наиболее оптимальную процедуру пробоподготовки и тщательно исследовать эффект матрицы, так как он вносит значительный вклад в ошибку определения [16].

Нами была разработана методика для определения икариина с применением ВЭЖХ-МС/МС с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации выбранных ионных переходов для положительных ионов [17]. Методика отличается специфичностью и воспроизводимостью.

В данной работе исследованы различные способы экстракции икариина, влияние матрицы на степень ионизации при определении действующего компонента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и растворители. В работе применяли следующие реактивы: икариин (> 98 %, Phytolab, Германия), в качестве внутреннего стандарта – куместрол (> 97,5 %, Sigma-Aldrich, Германия). Для проведения жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) использовали хлористый метилен «ч.д.а.» (МедХимПром, Россия), ацетонитрил «для хроматографии» (Chromasolv®, Merck, Германия), диэтиловый эфир «ч.д.а.» (МедХимПром, Россия), трет-бутилметилэтиловый эфир (Panreac, Испания), гексан «ч.д.а.» (МедХимПром, Россия), изобутиловый спирт «для хроматографии» (LiChrosolv®, Германия), изопропиловый спирт «для хроматографии» (LiChrosolv®, Германия), этилацетат (Chromasolv®, Sigma-Aldrich, Германия), метанол «для хроматографии» (Chromasolv®, Merck, Германия). Для приготовления фосфатного буферного раствора с pH = 6.5 использовали безводный дигидрофосфат калия «ч.д.а.» (Merck, Германия) и 12-водный гидрофосфат натрия «ч.д.а.» (Merck, Германия). Хлорид натрия «ч.д.а.» получен от фирмы Sigma-Aldrich (Германия), концентрированная соляная кислота – ХимМед (Россия). Карбонатный буферный раствор

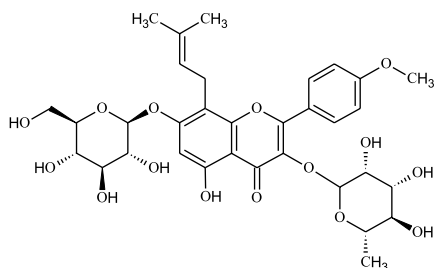


Рис. 1. Структурная формула икариина (брутто-формула C₃₃H₄₀O₁₅, M = 676.2367)

с pH = 10.0 готовили из карбоната и гидрокарбоната калия «ч.д.а.» (ХимМед, Россия). Ферментативный гидролиз проводили с бета-глюкуронидазой из E-coli K 12 (раствор в 50 % глицерине производства компании «Roche diagnostics GmbH», Германия).

Твёрдофазную экстракцию (**ТФЭ**) проводили на картриджах SUPELCO HLB 200 мг и DSC-18 200 мг. Для приготовления подвижной фазы использовали деионизованную воду с удельным сопротивлением $18.2 \text{ мОм} \cdot \text{см}^{-1}$, полученную с помощью установки NANO Pure (Thermo Scientific, США). Муравьиная кислота (Fluka, Швейцария) служила в качестве модификатора подвижной фазы.

Оборудование. Исследования проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Ultimate 3000, оснащенного авто-сэмплером Dionex Ultimate 3000 RS Autosampler, градиентным насосом Dionex Ultimate 3000 RS Pump, дегазатором и блоком для термостатирования хроматографической колонки с гибридным масс-спектрометром QExactive с орбитальной ионной ловушкой высокого разрешения (Thermo Scientific, Германия) и источником ионизации IonMax HESI-II. В качестве распыляющего и вспомогательного газа использовали азот от генератора азота Genius 1022 (Peak Scientific, Шотландия). Обработку данных проводили с применением программного обеспечения Xcalibur версии 2.2 (Thermo Scientific, США).

Условия хроматографического разделения. Хроматографическое разделение проводили на колонке с обращенно-фазовым сорбентом Hypersil Gold aQ, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2.1 мм, размером зерна сорбента 3 мкм, фирмы «Thermo Scientific». Температура термостатирования колонки составляла 45°C , объемная скорость потока подвижной фазы – $0.6 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$. В качестве подвижной фазы использовали 0.1 %-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 5 : 95 (об. : об.) (**А**) и 0.1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (**В**). Хроматографическое разделение веществ проводили в режиме градиентного элюирования: 0-1 минут – 20 % В; 4 минут – 25 % В; 4.5 минут – 40 % В; 7.5 минут – 95 % В; 7.5-10.5 минут – 95 % В; 11 минут – 20 % В. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 15 минут. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Условия масс-спектрометрического определения. Масс-спектры получали в условиях ИЭР при атмосферном давлении. Напряжение на капилляре составляло 4.0 кВ; температура капилляра – 270°C ; температура на распылителе – 280°C ; скорость потока распыляющего газа (азот) – $0.40 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1}$; скорость потока вспомогательного газа (азот) – $0.1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1}$; скорость потока газа-осушителя (азот) – $0.05 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1}$. Детектирование осуществляли при

регистрации положительных ионов в диапазоне масс 100-1550 Да с разрешением 35 000 (на половине высоты) и точностью определения масс 5 млн^{-1} . Масс-спектры второго порядка получали высокоэнергетической диссоциацией соударением (**НСД**) при энергии 40 % (для икариина) и 45 % (для куместрола).

Приготовление стандартных растворов и построение градуировочных зависимостей. Навески икариина и внутреннего стандарта – куместрола по 1 мг растворяли в 1 мл метанола. Полученные растворы использовали для приготовления серий градуировочных растворов с концентрациями 200, 150, 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.0025, 0.001 и $0.0005 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Пробоподготовка биологической жидкости.

Анализ после разбавления. К образцу мочи (5 мл) добавляли 0.05 мл внутреннего стандарта, содержащего куместрол ($0.1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Затем вносили 6.5 мл ацетонитрила, тщательно перемешивали, центрифугировали в течение 10 минут при $13400 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Отбирали 1 мл надосадочного слоя и анализировали.

ЖЖЭ. К образцу мочи (5 мл) добавляли 0.05 мл внутреннего стандарта, при проведении ферментативного гидролиза вносили 1 мл фосфатного буфера с pH = 6.5, 0.03 мл раствора бета-глюкуронидазы и инкубировали в течение 80 минут при 55°C . Затем для осуществления кислой экстракции добавляли 0.05 мл концентрированной соляной кислоты, для щелочной – 1 мл карбонатного буферного раствора с pH = 10.0. После чего вносили 1 г хлорида натрия и тщательно перемешивали. Экстрагировали 5 мл органического растворителя или смесью растворителей в течение 10 минут на автоматическом экстракторе. Центрифугировали при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 10 минут, органический экстракт упаривали досуха в токе азота при комнатной температуре. Сухой остаток перерастворяли в 0.1 мл подвижной фазы В и анализировали.

ТФЭ. К образцу мочи (5 мл) добавляли 0.05 мл внутреннего стандарта. Кондиционирование сорбента проводили путем последовательного пропускания через картридж 4 мл метанола и 4 мл воды. Далее загружали 5 мл образца со скоростью $1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$. Промывку осуществляли последовательно 4 мл воды. Патрон сушили под вакуумом в течение 5 минут. Элюировали 4 раза по 1 мл метанола. Элюат упаривали досуха в токе азота, сухой остаток перерастворяли в 0.1 мл подвижной фазы В и анализировали.

Валидацию разработанной методики проводили согласно руководству по валидации биоаналитических методов [18] и методическим рекомендациям ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [19] и ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами [17, 21] был разработан способ определения икариина в водно-спиртовых экстрактах из растительного сырья методом ВЭЖХ-МС/МС, исследованы процессы фрагментации действующего вещества горянки при высокоэнергетической диссоциации соударением с использованием ионизации электрораспылением при атмосферном давлении с различными режимами регистрации, предложена интерпретация полученных спектров, а также определены оптимальные приборные и масс-спектральные параметры идентификации икариина (энергия соударений – 40 %, ионный переход в условиях регистрации положительных ионов – с $m/z = 677.2433 \rightarrow 313.0703$ (100 %), 369.1330 (35 %)). Энергия столкновений для внутреннего стандарта составила 50 %, а ионный переход – с $m/z = 269.0445 \rightarrow 241.0491$ (100 %), 197.0595 (100 %), 213.0543 (72 %), 225.0543 (25 %).

В качестве модельной биожидкости использовали мочу человека, так как она наиболее информативна для оценки профиля экскреции. Для получения образца с концентрацией целевого вещества $0.1 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ в 5 мл мочи вносили 0.1 мл раствора икариина с концентрацией $5 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$. В качестве интактного образца использовалась моча без внесения активного компонента.

Учитывая свойства аналита, метод анализа и объект исследований было выбрано несколько направлений разработки процедур пробоподготовки.

1. Анализ супернатанта после осаждения «мажорных» белков ацетонитрилом и центрифугирования.

2. ЖЖЭ. С целью подбора оптимального метода выбрали три типа экстракции (щелочную, нейтральную и кислую) с использованием экстрагирующих систем с разными индексами полярности и элюирующей силой [22], таких как хлористый метилен; ацетонитрил; смесь диэтилового и трет-бутилметилового эфиров в соотношении 9 : 1 (по объёму); смесь гексана с хлористым метиленом в соотношении 85 : 15 (по объёму); смесь изобутило-

вый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40 : 30 : 30 по объёму).

При проведении ферментативного гидролиза с бета-глюкуронидазой обнаружено, что ещё до инкубирования икариин гидролизуется до икаризид II и икаритина (рис. 2), что делает невозможным использование данного фермента для процесса пробоподготовки биологических образцов с целью обнаружения непосредственно активного компонента, однако может быть использован для группового определения флавоноидов горянки.

3. ТФЭ. Для пробоподготовки были выбраны картриджи SUPELCO DSC-18 и HLB, последние благодаря развитой гидрофильно-липофильной поверхности сорбента способны удерживать широкий диапазон соединений с разной полярностью.

Контроль полноты экстракции и остальных аналитических этапов пробоподготовки (таких как очистка и концентрирование пробы) проводили методом добавок внутреннего стандарта (близкое по структуре и экстракционным свойствам соединение – куместрол (рис. 3)). Идентификацию аналитов в образцах проводили по трём параметрам: время удерживания (икариина – 4.4 минуты, куместрола – 5.0 минут), выбранные характеристичные ионы и соотношения интенсивностей выбранных ионов, которые оставались постоянными в широком диапазоне концентраций.

Результаты выбора процедур пробоподготовки представлены в таблице. Как видно из представленных результатов, наибольшего извлечения удалось достигнуть при проведении прямого анализа супернатанта и после твердофазной экстракции с картриджами SUPELCO DSC-18 и HLB. Приведенные в таблице данные также свидетельствуют о том, что при проведении ЖЖЭ две экстрагирующие системы: ацетонитрил и смесь изобутилового, изопропилового спиртов и этилацетата в щелочных условиях показывают наилучшие коэффициенты по извлечению (79 и 73 % соответственно).

Для оценки селективности выбранных характеристичных ионных переходов изучили влияние мешающих фоновых веществ в биологической жидкости. Проанализировали 20 экстрактов интактных образцов мочи. На каждой хроматограмме производили анализ участков, соответствующих временам удерживания определяемых веществ в пределах одной минуты. Селективность считали приемлемой, если на всех хроматограммах на указанных участках не было интерферирующих пиков с отношением сигнал/шум более или равным 3 : 1.

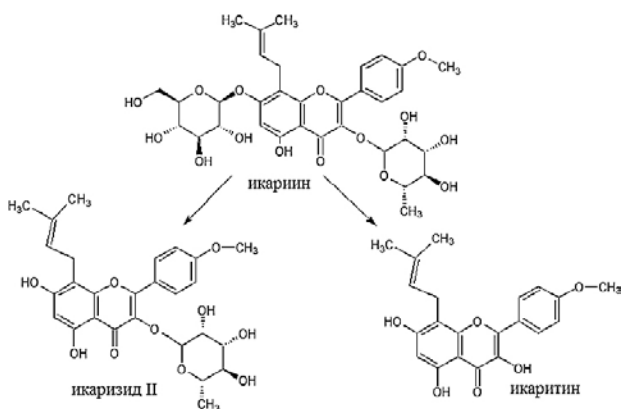


Рис. 2. Схема гидролиза икариина под действием бета-глюкуронидазы

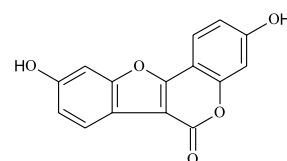


Рис. 3. Структурная формула куместрола (брутто-формула $C_{15}H_8O_5$, $M = 268.0372$)

Таблица

Результаты исследований по выбору процедур пробоподготовки ($P = 0.95$, $n = 10$)

Тип экстракции	Экстрагирующая система	Икариин	
		Коэффициент извлечения, %	Матричный фактор, нормализованный на внутренний стандарт, %
ЖЖЭ кислая	Хлористый метилен	19	19
	Ацетонитрил	53	11
	Диэтиловый эфир: трет-бутил-метиловый эфир (9: 1 по объёму)	15	21
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0	19
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40:30:30 по объёму)	35	12
ЖЖЭ щелочная	Хлористый метилен	2	13
	Ацетонитрил	79	19
	Диэтиловый эфир: трет-бутил-метиловый эфир (9: 1 по объёму)	9	25
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0	23
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40:30:30 по объёму)	73	9
ЖЖЭ нейтральная	Хлористый метилен	6	20
	Ацетонитрил	72	18
	Диэтиловый эфир: трет-бутил-метиловый эфир (9: 1 по объёму)	31	17
	Гексан: хлористый метилен (85: 15 по объёму)	0	24
	Изобутиловый спирт: изопропиловый спирт: этилацетат (40:30:30 по объёму)	49	9
ТФЭ SUPELCO HLB 200 мг		97	4
ТФЭ DSC-18 200		90	7
Прямой анализ		99	35

На специфичность и чувствительность определения веществ с использованием масс-селективного детектора может влиять подавление ионизации компонентами матрицы. Основной причиной подавления электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении является изменение свойств спрея из-за наличия малолетучих или нелетучих растворенных веществ (ион-парные реагенты, соли, лекарственные препараты и др.), влияющих на эффективность образования или испарения капель в спрее, тем самым, на количество заряженных ионов в газовой фазе, попадающих затем в масс-спек-

трометр [23, 24]. Подавление ионизации полярных аналитов больше, чем менее полярных [25].

Матричный эффект исследовали с использованием различных вариантов введения целевых соединений. Матричный фактор, нормализованный на внутренний стандарт, вычисляли по формуле, представленной в работе [18]:

$$MF_{\text{норм}}(\%) = \frac{MF_{\text{аналит}}}{MF_{\text{внутр.станд.}}} 100 \%$$

где $MF_{\text{аналит}}$ – отношение площади пика аналита в присутствии матрицы (матрица после экстракции с добавлением в нее аналита) к площади пика в отсутствии матрицы (чистый раствор аналита);

$MF_{\text{внутр.станд.}}$ – отношение площади пика внутренне-го стандарта в присутствии матрицы (матрица после экстракции с добавлением в нее внутреннего стандарта) к площади пика в отсутствии матрицы (чистый раствор внутреннего стандарта).

Степень подавления ионизации фоновыми компонентами матрицы для икариина при прямом анализе супернатанта составляет 35 %, в то время как при ТФЭ с картриджами SUPELCO DSC-18 и HLB – 7 и 4 %, соответственно (табл. 1).

Учитывая степень экстракции и эффект матрицы, сделан вывод, что наиболее приемлемым способом пробоподготовки является ТФЭ с картриджами HLB, при котором предел обнаружения икариина составляет 0.001 мкг·мл⁻¹.

Для оценки влияния используемых в процессе пробоподготовки рутинных образцов биологических проб реактивов на степень ионизации аналитов провели анализ экстракта воды, подверженной всем стадиям подготовки проб к анализу. При этом существенного эффекта подавления ионизации реактивами не наблюдали.

Сравнительный анализ 20 образцов мочи показал, что степень извлечения аналитов и подавление их ионизации матрицей не меняются от образца к образцу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения икариина в моче методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием ЭРИ в режиме регистрации выбранных ионных переходов для положительных ионов. Оценены степень извлечения (97 %), влияние матрицы на подавление ионизации аналита (4 %), предел обнаружения (1 нг·мл⁻¹). Разработанный способ является специфичным и чувствительным, позволяющим сочетать как качественное, так и количественное определение икариина в биопробах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Editorial Committee of Pharmacopoeia of Ministry of Health PR China, The Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1. Beijing: China Chemical Industry Press, 2010. P. 306-308.
2. Xu H.-B., Huang Z.-Q. Icariin enhances endothelial nitric oxide synthase expression on human endothelial cells in vitro // Vasc. Pharm. 2007. V. 47, № 1. P. 18-24.
3. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of Epimedium species / P. Shen [et al.] // Phytochemistry. 2007. V. 68, № 10. P. 1448-1458.
4. The genus Epimedium: an ethnopharmacological and phytochemical review / H.P. Ma [et al.] // J. Ethnopharmacol. 2011. V. 134, № 3. P. 519-541.
5. Huang X., Zhu D.Y., Lou Y.J. A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G1 arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells // Eur. J. Pharmacol. 2007. V. 564, № 1-3. P. 26-36.
6. Humfrey C.D. Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence // Nat. Toxins. 1998. V. 6, № 2. P. 51-59.

7. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women / D.T. Felson [et al.] // N. Engl. J. Med. 1993. V. 329, № 16. P. 1141-1146.
8. Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice / Y. Pan [et al.] // Pharmacol. Biochem. Behav. 2005. V. 82, № 4. P. 686-694.
9. Icariin attenuates social defeat-induced down-regulation of glucocorticoid receptor in mice / J. Wu [et al.] // Pharmacol. Biochem. Behav. 2011. V. 98, № 2. P. 273-278.
10. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of metabolites in rats after administration of prenylflavonoids from Epimediums / H.Y. Zhao [et al.] // J. Chromatogr. B. 2010. V. 878, № 15-16. P. 1113-1124.
11. Liu J., Lou Y.J. Determination of icariin and metabolites in rat serum by capillary zone electrophoresis: rat pharmacokinetic studies after administration of icariin // J. Pharm. Biomed. Anal. 2004. V. 36, № 2. P. 365-370.
12. Pharmacokinetics of prenylflavonoids and correlations with the dynamics of estrogen action in sera following ingestion of a standardized Epimedium extract / S.P. Wong [et al.] // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2009. V. 50, № 2. P. 216-223.
13. Identification of the major chemical constituents and their metabolites in rat plasma and various organs after oral administration of effective Erxian Decoction (EXD) fraction by liquid chromatography-mass spectrometry / Y.M. Hu [et al.] // Biomed. Chromatogr. 2010. V. 24, № 5. P. 479-489.
14. LC–MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma / W. Xu [et al.] // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2007. V. 45, № 4. P. 667-672.
15. Дикунец М.А., Апполонова С.А., Родченков Г.М. Влияние матрицы на определение синтетических кортикостероидов и диуретиков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией // Журнал физической химии. 2009. Т. 83, № 4. С. 1-8.
16. Korfmacher W.A. Using mass spectrometry for drug metabolism studies. N.Y. etc: CRC, 2005. 270 p.
17. Определение флавоноидов горянки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием / О.А. Шевлякова [и др.] // Масс-спектрометрия. 2015. Т. 12, № 2. С. 117-123.
18. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 2013. [Электронный ресурс]: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf> (дата обращения 2 сентября 2015).
19. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. Введ. 1 ноября 2002. М.: Госстандарт России, 2002. 32 с.
20. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. Введ. 1 ноября 2002. М.: Госстандарт России, 2002. 42 с.
21. Применение tandemной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением для идентификации икариина в растительном сырье / О.А. Шевлякова [et al.] // Масс-спектрометрия. 2014. Т. 11, № 4. С. 247–254.
22. Отто М. Современные методы аналитической химии: пер. с нем. под ред. А.В. Гармаша. М.: Техносфера, 2003. Т. 2. 281 с.

23. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization / R. King [et al.] // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000. V. 11, № 11. P. 942-950.
24. Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples / J.L. Sterne [et al.] // *J. Mass Spectrom.* 2000. V. 35, № 3. P. 385-391.
25. The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds / R. Bonfiglio [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999. V. 13, №12. P. 1175-1185.

REFERENCES

1. *Editorial Committee of Pharmacopoeia of Ministry of Health PR China, The Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1. Beijing:* China Chemical Industry Press, 2010, pp. 306-308.
2. Xu H.-B., Huang Z.-Q. Icariin enhances endothelial nitric oxide synthase expression on human endothelial cells in vitro. *Vasc. Pharm.*, 2007, vol. 47, no. 1, pp. 18-24. doi: 10.1016/j.vph.2007.03.002.
3. Shen P., Guo B.L., Gong Y., Hong D.Y., Hong Y., Yong E.L. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of Epimedium species. *Phytochemistry*, 2007, vol. 68, no. 10, pp. 1448-1458. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.03.001.
4. Ma H.P., He X.R., Yang Y., Li M.X., Hao D.J. The genus Epimedium: an ethnopharmacological and phytochemical review. *J. Ethnopharmacol.*, 2011, vol. 134, no. 3, pp. 519-541. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.001.
5. Huang X., Zhu D.Y., Lou Y.J. A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G1 arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, vol. 564, no. 1-3, pp. 26-36. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.02.039.
6. Humfrey C.D. Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence. *Nat. Toxins.*, 1998, vol. 6, no. 2, pp. 51-59. doi: 10.1002/(SICI)1522-7189(199804)6:2<51::AID-NT11>3.0.CO;2-9.
7. Felson D.T., Zhang Y., Hannan M.T., Kiel D.P., Wilson P.W., Anderson J.J. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women. *N. Engl. J. Med.*, 1993, vol. 329, no. 16, pp. 1141-1146. doi: 10.1056/NEJM199310143291601.
8. Pan Y., Kong L., Xia X., Zhang W., Xia Z., Jiang F. Anti-depressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2005, vol. 82, no. 4, pp. 686-694. doi: 10.1016/j.pbb.2005.11.010.
9. Wu J., Du J., Xu C., Le J., Xu Y., Liu B., Dong B. Icariin attenuates social defeat-induced down-regulation of glucocorticoid receptor in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2011, vol. 98, no. 2, pp. 273-278. doi: 10.1016/j.pbb.2011.01.008.
10. Zhao H.Y., Fan M.X., Fan L., Sun J.H., Guo D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of metabolites in rats after administration of prenylflavonoids from Epimediums. *J. Chromatogr. B.*, 2010, vol. 878, no. 15-6, pp. 1113-1124. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.03.023.
11. Liu J., Lou Y.J. Determination of icariin and metabolites in rat serum by capillary zone electrophoresis: rat pharmacokinetic studies after administration of icariin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, vol. 36, no. 2, pp. 365-370. doi: 10.1016/j.jpba.2004.06.021.
12. Wong S.P., Shen P., Lee L., Li J., Yong E.L. Pharmacokinetics of prenylflavonoids and correlations with the dynamics of estrogen action in sera following ingestion of a standardized Epimedium extract. *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 2009, vol. 50, no. 2, pp. 216-223. doi: 10.1016/j.jpba.2009.04.022.
13. Hu Y.M., Wang Y.T., Sze S.C.W., Tsang K.W., Wong H.K., Liu Q., Zhong L.D., Tong Y. Identification of the major chemical constituents and their metabolites in rat plasma and various organs after oral administration of effective Erxian Decoction (EXD) fraction by liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 2010, vol. 24, no. 5. P. 479-489. doi: 10.1002/bmc.1315.
14. Xu W., Zhang Y., Yang M., Shen Z., Zhang X., Zhang W., Li H. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma. *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 2007, vol. 45, no. 4. P. 667-672. doi: 10.1016/j.jpba.2007.07.007.
15. Dikunets M.A., Appolonova S.A., Rodchenkov G.M. The matrix effect on determination of synthetic corticosteroids and diuretics by HPLC method with tandem mass spectrometry. *Rus. J. Phys. Chem.*, 2009, vol. 83, no. 4, pp. 1-8.
16. Korfmacher W.A. *Using mass spectrometry for drug metabolism studies.* N.Y. etc: CRC, 2005. 270 p.
17. Shevlyakova O.A., Vasil'yev K.J., Ihalaynen A.A., Antokhin A.M., Taranchenko V.F., Goncharov V.M., Aksenov A.V., Mitrofanov D.A., Rodin I.A., Shpigun O.A. Determination of flavonoids of Epimedium by high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometric detection. *J. Mass Spectrometry*, 2015, vol. 12, no. 2, pp. 117-123.
18. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.* U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2013. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf> (Accessed 2 September 2015).
19. GOST R ISO 5725-1-2002. *Tochnost' (pravil'nost' i prettsizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenii. Chast' 1. Osnovnye polozheniia i opredeleniia* [State Standard R ISO 5725-1-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1. General principles and definitions]. Moscow, GosStandart, 2002. 32 p. (in Russian).
20. GOST R ISO 5725-2-2002 *Tochnost' (pravil'nost' i prettsizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenii Chast' 2. Osnovnoi metod opredeleniia povtoriaemosti i vosproizvodimosti standartnogo metoda izmerenii* [State Standard R ISO 5725-2-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method]. Moscow, GosStandart, 2002. 42 p. (in Russian).
21. Shevlyakova O.A., Ihalaynen A.A., Antokhin A.M., Taranchenko V.F., Goncharov V.M., Aksenov A.V., Mitrofanov D.A., Rodin I.A., Shpigun O.A. Application of tandem electrospray/ionization mass spectrometry for identification of icariin in plant materials. *J. Mass Spectrometry*, 2014. vol. 11, no. 4. pp. 247-254.
22. Otto M. *Modern methods of analytical chemistry.* Moscow, Technosphere, 2003, vol. 2. 281 p.
23. King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C., Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2000, vol. 11, no. 11, pp. 942-950. doi: 10.1016/S1044-0305(00)00163-X.
24. Sterne J.L., Johnston M.V., Nicol G.R., Ridge D.P. Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples. *J. Mass Spectrom.*, 2000, vol. 35, no. 3, pp. 385-391.
25. Bonfiglio R., King R.C., Olah T.V., Merkle K. The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1999, vol. 13, no. 12, pp. 1175-1185. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19990630)13:12<1175::AID-RCM639>3.0.CO;2-0.